

III. DETERMINACION DEL PALMITATO DE SITOSTEROL POR CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA Y SU POSIBLE UTILIZACION COMO INDICE DE INTERACCION GENOMICA (1)

POR

F. GARCIA OLMEDO

Doctor Ingeniero Agrónomo y Licenciado en Ciencias Químicas.

INTRODUCCION

El contenido en palmitato de sitosterol, según hemos establecido en nuestro trabajo anterior (García Faure y colaboradores, 1965), constituye un índice de la presencia de productos de *Triticum aestivum* (incl. *T. vulgare*) en las pastas alimenticias. La diferencia en dicho contenido entre las especies *T. aestivum* y *T. durum* es significativa y consistente. El 80 por 100 de las variedades ensayadas de *T. aestivum* presentaron un contenido en palmitato superior (7,0-11,3 mg./100 g. de endospermo) al de la totalidad de las de *T. durum* (0,5-1,0 mg./100 g.).

El método analítico empleado, aún permitiendo determinar el palmitato de sitosterol sin ambigüedad, presenta ciertas dificultades que se derivan de la incompleta separación de esta sustancia por precipitación a baja temperatura y del largo e inseguro procedimiento experimental.

(1) El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación (Project E25-AMS-7) que se realiza en el Laboratorio de Tecnología de Cereales del I. N. I. A., en colaboración con el U. S. D. A. (P. L. 480), bajo la dirección del doctor ingeniero García Faure. Asimismo ha sido incluido en la tesis doctoral del autor («Diferenciación bioquímica de las especies *T. durum* y *T. aestivum* (incl. *T. vulgare*)»).

El procedimiento analítico seguido es el siguiente: Se extraen 10 g. de harina o pasta molida en un extractor Soxhlet con éter dietílico, y el extracto se disuelve en cloroformo hasta un volumen de 2 ml.

Cuando la valoración se lleva a cabo sobre la misma placa se utilizan capas de 0,3 mm. de espesor. Se depositan 20 microlitros de la solución clorofórmica en un solo punto. El número de cienmiligramos separados es el de mg./100 g. de palmitato de sitosterol que contiene la harina. Los cromatogramas se desarrollan con tetracloruro de carbono 100 por 100 a 20° C., durante ochenta minutos, en un tanque cerrado herméticamente. El revelado se lleva a cabo pulverizando con ácido sulfúrico concentrado (al 50 por 100 en agua destilada) y calentando a 200° C.

Cuando se ha de separar una cantidad de palmitato de sitosterol suficiente para su valoración por la reacción colorimétrica de Tchugaeff, se emplean capas de $200 \times 200 \times 1$ mm., divididas mecánicamente en seis bandas de aproximadamente 3,5 cm. de ancho. Se depositan 0,2 ml. de solución clorofórmica de forma continua a todo lo ancho de la banda con la ayuda de una micropipeta (figura 4). Se localiza el palmitato de sitosterol separado revelando con fluoresceína sódica (al 0,5 por 100 en etanol) y observando a la luz ultravioleta un duplicado de la banda. Se raspa la zona de gel de sílice G que contiene el palmitato mediante un dispositivo similar al descrito por Mottier (1958). A continuación se eluye esta sustancia con cloroformo, recogiendo los 3 ml. primeros de eluato sobre una cubeta colorimétrica debidamente aforada. La valoración colorimétrica por la reacción de Tchugaeff se lleva según se ha descrito en el trabajo anterior.

RESULTADOS Y DISCUSION

Separación de los palmitatos de sitosterol y sitostanol por cromatografía en capa fina.

Hemos encontrado que cuando se cromatografía el extracto etéreo del endospermo de *T. aestivum* en capa fina de gel de sílice G impregnada con nitrato de plata, desarrollando con tetracloruro de carbono, sólo se separan dos fracciones, cuyos Rf son idénticos a los de los palmitatos de sitosterol y sitostanol. Anteriormente hemos descrito (García Faure y colaboradores, 1965) el fraccionamiento por la misma técnica del precipitado obtenido a partir del extracto acetónico disuelto en acetona y enfriado a — 5° C. Este precipitado no se fraccionaba por la técnica de Gilles y Young (1964) (fi-

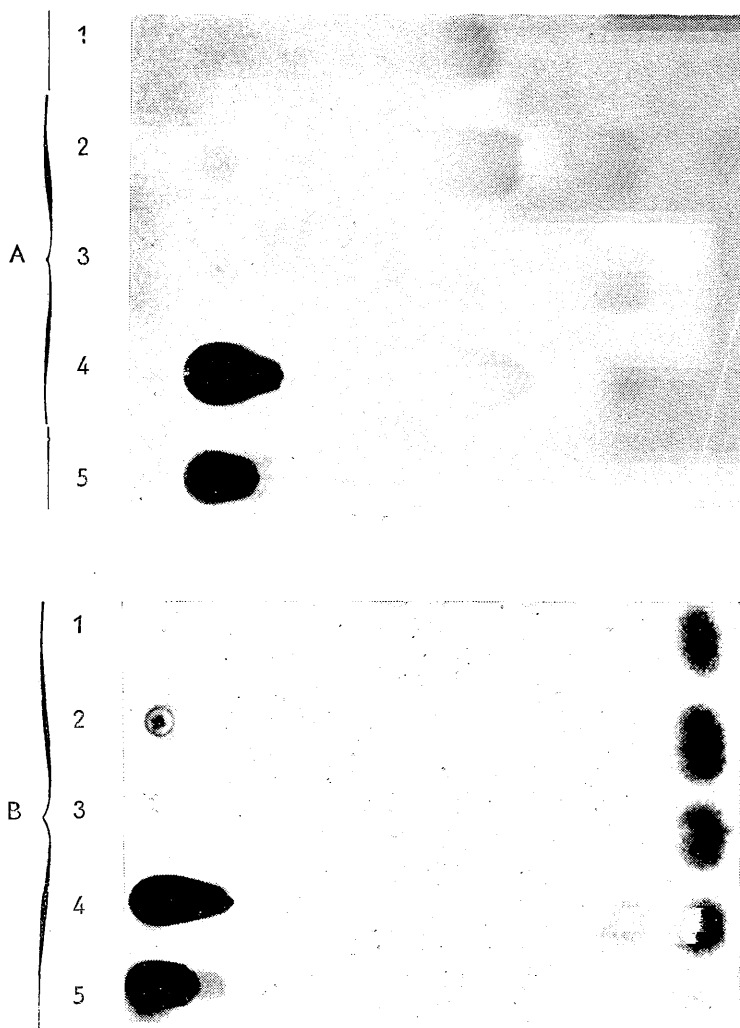


FIGURA 2.

- 1) *Palmitato de sitosterol.* 2) *Precipitado recrystalizado.* 3) *Palmitato de sitostanol.*
 - 4) *Extracto etéreo T. aestivum.* 5) *Extracto etéreo T. durum.*
- A) *Separación sobre sílice impregnada.*
 B) *Separación sobre sílice sola.*

Capa: Si O₂ (5% NO₃ Ag)

Desarrollo: Cl₄ C

Capa: Si O₂

Desarrollo: Cl₄ C

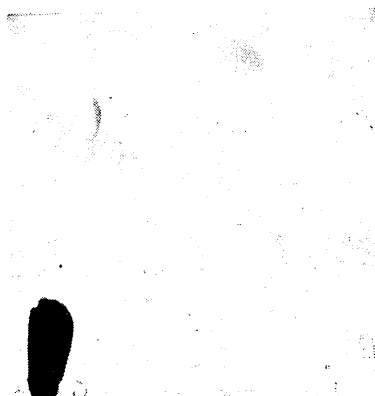


FIGURA 3.

Cromatografía bidimensional sobre capa parcialmente impregnada del extracto etéreo de T. aestivum.

Palmitato de
sitostanol

Palmitato de
sitosterol



T.aestivum

T.durum

FIGURA 4.

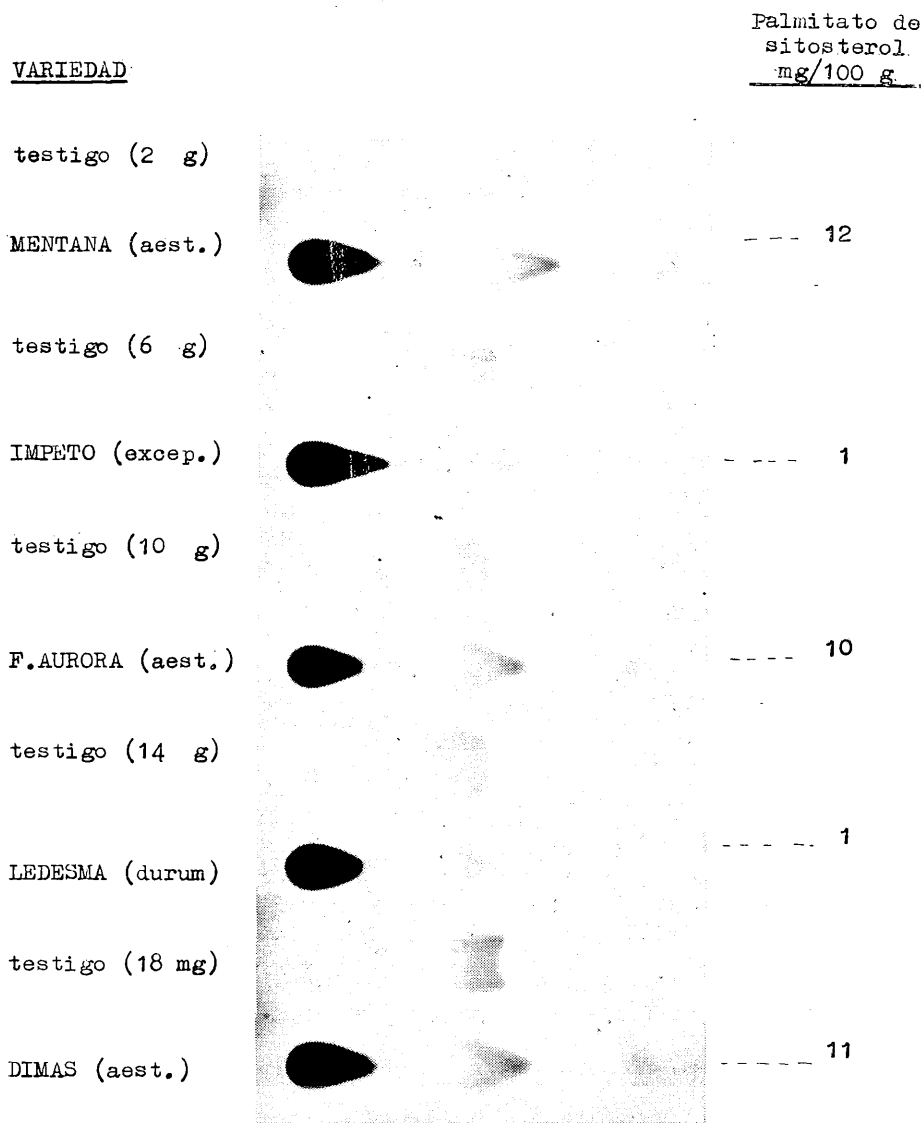


FIGURA 5.

Absorbente: gel de sílice con nitrato de plata al 5 por 100.

Desarrollo: tetracloruro de carbono al 100 por 100.

Revelado: ácido sulfúrico al 50 por 100.

gura 2). Por cromatografía bidimensional sobre capa parcialmente impregnada con nitrato de plata, desarrollando con tetracloruro de carbono en ambas direcciones, hemos podido comprobar que sólo la mancha considerada como palmitato de sitosterol por dichos investigadores progresa en la parte impregnada, dando lugar a las mencionadas fracciones (figura 3).

La resolución de la separación cromatográfica que proponemos sigue siendo considerable a escala preparativa (figura 4).

Valoración del palmitato de sitosterol.

La valoración del palmitato de sitosterol separado puede realizarse sobre la misma placa cromatográfica, previo revelado, o colorimétricamente, después de eludir con un disolvente apropiado.

En el primer caso se cromatografían los extractos etéreos (procedente cada uno de 0,1 g. de harina), conjuntamente con un número adecuado de patrones (figura 5). Por simple comparación visual puede realizarse la estimación semicuantitativa del palmitato de sitosterol presente en la muestra. El empleo de un densitómetro de reflexión para capa fina hace este método cuantitativo. La densitometría de transmisión sobre la reproducción fotográfica de la placa es un procedimiento más largo y susceptible de error, por lo que no es aconsejable.

Para la valoración colorimétrica se cromatografía el extracto etéreo de 1 g. de harina o pasta molida. Siendo la muestra mayor que en el caso anterior, el procedimiento experimental es más seguro.

Comparación con el método físico-químico. Reproductividad.

En el cuadro I se comparan los resultados obtenidos por el método de separación cromatográfica y valoración colorimétrica y por el método físico-químico para una serie de pastas obtenidas de mezclas de una variedad de *T. aestivum* («Rojo») y otra de *T. durum* («Andalucía»). Los valores obtenidos por el primer método se ajustan mejor a la ley de las mezclas, especialmente para proporciones bajas de *T. aestivum*, y son más altos que los obtenidos por el método físico-químico. Esto concuerda con la observación de que la separación del palmitato de sitosterol a partir del extracto acetónico disuelto en acetona, por precipitación a -5° C., no es cuantitativa.



CUADRO I

COMPARACION CON EL METODO FISICO-QUIMICO

M U E S T R A	CONTENIDO EN PALMITATO DE SITOSTEROL (mg./ 100 g.)	
	Método físico-químico	Método cromatográfico
Andalucía 100 por 100.....	0,5	0,7
Andalucía 90 por 100, rojo 10 por 100.....	0,4	2,7
Andalucía 80 por 100, rojo 20 por 100.....	1,6	3,8
Andalucía 70 por 100, rojo 30 por 100.....	2,3	4,5
Andalucía 60 por 100, rojo 40 por 100.....	2,8	6,0
Andalucía 50 por 100, rojo 50 por 100.....	4,5	7,7
Andalucía 40 por 100, rojo 60 por 100.....	5,2	—
Andalucía 30 por 100, rojo 70 por 100.....	6,9	10,4
Andalucía 20 por 100, rojo 80 por 100.....	9,4	11,2
Andalucía 10 por 100, rojo 90 por 100.....	10,3	12,6
Rojo 100 por 100.....	11,0	14,2

En el cuadro II se expone el ensayo de reproductividad del método cromatográfico para distintos contenidos en palmitato de sitosterol. La reproductividad del método es satisfactoria incluso para bajos contenidos en dicha sustancia.

CUADRO II

ENSAYO DE REPRODUCTIVIDAD

DETERMINACION NUMERO	CONTENIDO EN PALMITATO DE SITOSTEROL (mg./100 g.)			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
1.....	1,2	3,7	6,6	10,4
2.....	1,2	3,9	6,6	10,8
3.....	1,1	3,9	6,4	10,4
4.....	1,2	3,8	6,9	10,6
5.....	1,1	3,9	6,8	—
\bar{x}	1,16	3,84	6,66	10,6
s.....	0,054	0,089	0,181	0,161
$\frac{s}{\bar{x}}$	4,6	2,3	2,7	1,5

El palmitato de sitosterol como posible índice de interacción genómica.

La hipótesis del origen del trigo hexaploide por anfidiplodia natural entre un trigo tetraploide y la especie *Aegilops squarrosa*, ha sido confirmada por la obtención del correspondiente anfidiplode sintético. La constitución genómica de la especie *Triticum aestivum* (AABBDD) es, por tanto, la suma de las especies *Triticum durum* (AABB) y *Aegilops squarrosa* (DD). Los cromosomas del genomio D sólo guardan con los de los genomios A y B una homología ancestral (homeología), por lo que el trigo hexaploide se comporta funcionalmente como un diploide. Un alto contenido en palmitato de sitosterol, como diferencia interespecífica entre *T. aestivum* y *T. durum*, parece estar asociado al genomio de *Ae. squarrosa* (D).

Estudiando el *Triticum spelta* (AABBDD), obtenido sintéticamente por Kihara por anfidiplodia, entre *Triticum carthlicum* (AABB) y *A. squarrosa* (DD), hemos podido comprobar que esta última especie tiene un nivel alto en palmitato de sitosterol y que este nivel parece mantenerse en el *Triticum spelta*. Igualmente hemos encontrado que la especie *Secale cereale* tiene un nivel alto en palmitato de sitosterol y lo transmite al *Triticale hexaploide* (*T. durum-Secale cereale*) correspondiente.

En la actualidad se supone que los genomios que entran a formar parte de una especie sintética mantienen su identidad y probablemente contribuyen de forma aditiva al mecanismo de la biosíntesis (Unrau y Jenkins, 1964). Nosotros nos proponemos estudiar cuantitativamente la interacción entre genomios en *Triticales* hexaploides y octaploides, utilizando como índice el contenido en palmitato de sitosterol.

R E S U M E N

Se describe la separación del palmitato de sitosterol, por cromatografía en capa fina de gel de sílice G impregnada con nitrato de plata, a partir del extracto etéreo de la harina o la pasta molida, así como su valoración colorimétrica (reproductividad 1,5-4,6 por 100).

Se han analizado los anfidiplodes sintéticos *Triticum spelta* (*T. carthlicum-Aegilops squarrosa*) y *Triticale hexaploide* (*T. durum-Secale cereale*), y sus correspondientes especies parentales, a modo de estudio preliminar sobre la posible utilización del contenido en palmitato de sitosterol como índice de interacción genómica.

SUMMARY

A method for the separation and estimation of sitosteryl palmitate in paste products is described. Sitosteryl palmitate is separated from the ether extract on thin layers of silver nitrate impregnated silicagel G and estimated, after elution, by Tchugaeff color reaction (rep. 1,5-4,6 %).

Two synthetic amphidiplids, *Triticum spelta* (*T. carthlicum-Aegilops squarrosa*) and *Triticale* hexaploide (*T. durum-Secale cereale*) and their parental species have been analyzed to explore the possible use of sitosteryl palmitate content as a genome interaction index.

El autor desea expresar su agradecimiento al doctor ingeniero agrónomo García Faure y al profesor doctor ingeniero agrónomo Santa María Ledochowski por su constante consejo y ayuda; al profesor doctor ingeniero agrónomo Sánchez-Monge por sus sugerencias y amable cesión de muestras, y al señor Naranjo por la construcción del aparato de cromatografía en capa fina.

BIBLIOGRAFIA

- GARCÍA FAURE, R.; GARCÍA OLMEDO, F.; SOTFLO ABOY, I.; SALTO ANDRÉU, M. (1965): «Identificación de productos de *Triticum aestivum* en las pastas alimenticias». II. «Determinación colorimétrica del palmitato de sitosterol», *Boletín I. N. I. A.*
- GILLES, K. A.; YOUNG, V. L. (1954): «Evaluation of Durum wheat and Durum Products». II. «Separation and identification of the sitosterol esters of semolina», *Cereal Chem.*, 41 (6), 502.
- MORRIS, L. J. (1963): «Fractionation of cholesterol esters by Thin-Layer Chromatography», *J. Lipid. Res.*, 4 (3), 357.
- MOTTIER, M. (1958): «Mitt», *Gebiete Lebensm. u. Hyg.*, 49, 454.
- UNRAU, A. M.; JENKINS, B. C. (1964): «Investigation on synthetic cereal species. Milling, Baking, and some compositional characteristics of some *Triticale* and parental species», *Cereal Chem.*, 41 (5), 365-375.